# ความชุกและความหลากหลายของ Wolbachia ในประชากรยุงธรรมชาติ (Diptera: Culicidae) จากภาคกลางตอนล่างของประเทศไทย

# Prevalence and diversity of Wolbachia in wild mosquito (Diptera: Culicidae) populations from the lower central Thailand

สรัลวิชญ์ จีนแสร์[1], สุวิชญา ประทุมราช[2], ภัคพล ท้าวเวชสุวรรณ[2] และ ภาณุพงษ์ ทองเปรม[2]*

Sarunwitch Cheensae[1], Suwitchaya Pratumrach[2], Pakkapol Thaowetsuwan[2] and Panupong Thongprem[2*]

**Received**: 23 October 2024 ; **Revised**: 20 January 2025 ; **Accepted**: 26 February 2025

## บทคัดย่อ

ยุงเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์โดยจัดเป็นแมลงพาหะของโรคสำคัญหลายชนิด จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่ายุงมีแบคทีเรียร่วมอาศัยเช่น *Wolbachia* อาศัยอยู่ภายในเซลล์ของยุง แบคทีเรียร่วมอาศัยเหล่านี้มีผลต่อการดำรงชีวิต หรือแม้แต่กระบวนการวิวัฒนาการของยุงชนิดต่าง ๆ ด้วยการนี้มนุษย์จึงเลือกใช้ *Wolbachia* ในการควบคุมประชากรยุงเพื่อลดการแพร่ระบาดของเชื้อโรคที่มียุงเป็นพาหะได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยในกลุ่ม *Wolbachia* ในยุงที่พบในประเทศไทยนั้นมีอยู่น้อยมาก การศึกษานี้จึงเป็นการสำรวจความชุกชุมและความหลากหลายของ *Wolbachia* ในประชากรยุงที่อาศัยอยู่บางบริเวณของพื้นที่ภาคกลางตอนล่างของประเทศไทย จากการเก็บตัวอย่างยุงทั้งหมด 144 ตัว พบยุงทั้งหมด 4 สกุล 6 ชนิด ได้แก่ *Aedes* sp., *Ae. albopictus*, *Anopheles* sp., *Culex* sp., *Cx. quinquefasciatus* และ *Udaya argyrurus* โดยพบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในยุง 3 ชนิด จากวิธี PCR ได้แก่ *Ae. albopictus*, *Culex* sp. และ *Cx. quinquefasciatus* จากการศึกษา phylogenetic tree ของยีนตำแหน่ง *16S rRNA* ของ *Wolbachia* พบว่าทั้งหมดถูกจัดอยู่ใน supergroup B และมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของยุง องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะช่วยให้เข้าใจเกี่ยวกับวิวัฒนาการของยุงที่ได้รับอิทธิพลจาก *Wolbachia* และยังช่วยให้มนุษย์สามารถรับมือกับแมลงที่เป็นพาหะเหล่านี้ได้ดีอีกด้วย

**คำสำคัญ:** *Wolbachia,* แบคทีเรียร่วมอาศัย, วิวัฒนาการ, แมลง, ยุง

## Abstract

Mosquitoes are medically important insects, recognized as vectors for many serious diseases. Previous studies have shown that mosquitoes often harbor endosymbiotic bacteria, such as *Wolbachia*, within their cells. These endosymbiotic bacteria play vital roles in mosquito biology, including the evolution of various mosquito species. Consequently, humans have utilized *Wolbachia* to control mosquito populations, thereby reducing the spread of mosquito-borne diseases. However, data regarding the prevalence of *Wolbachia* symbiosis in mosquito populations in Thailand remains limited. This study aimed to investigate the prevalence and diversity of *Wolbachia* in mosquito populations inhabiting the lower central region of Thailand. A total of 144 mosquito samples were collected and identified as belonging to four genera and six species: *Aedes* sp., *Ae. albopictus*, *Anopheles* sp., *Culex* sp., *Cx. quinquefasciatus*, and *Udaya argyrurus*.

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

[2] หน่วยวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ต.พระปฐมเจดีย์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Wang Mai, Pathum Wan, Bangkok, 10330

[2] Biodiversity Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University Sanamchandra Palace Campus, Phrapathom Chedi, Maeung, Nakhon Pathom, 73000

* Corresponding author, e-mail: thongprem_p@su.ac.th

Three mosquito species tested positive for *Wolbachia* using PCR assays: *Ae. albopictus*, *Culex* sp., and *Cx. quinquefasciatus*. Phylogenetic analysis of the *Wolbachia* 16S rRNA gene revealed that all strains belonged to supergroup B, with diversity varying among mosquito species. The findings of this research contribute to a better understanding of mosquito evolution influenced by *Wolbachia*. Furthermore, this knowledge provides a basis for the effective control of these insect vectors.

**Keywords:** *Wolbachia*, endosymbionts, evolution, insects, mosquitoes

## บทนำ

ยุงจัดอยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Culicidae เป็นแมลงปรสิตภายนอกกินเลือดของคนและสัตว์มีกระดูกสันหลังเป็นอาหาร พบได้ในทุกพื้นที่ทั่วโลกยกเว้นในทวีปแอนตาร์กติกา ยุงเป็นแมลงที่มีความเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดต่อการดำรงชีวิตของผู้คนบนโลกอย่างมาก เนื่องจากเป็นพาหะนำโรค (vector) ของโรคติดต่อสำคัญหลายชนิดที่ทำให้ผู้คนเจ็บป่วยล้มตายจำนวนมาก เช่น มาลาเรีย (malaria) ที่มียุงก้นปล่อง (*Anopheles* spp.) เป็นพาหะ โรคไข้เลือดออกเด็งกี่ (dengue hemorrhagic fever) และโรคชิคุนกุนยา (chikungunya) ที่มียุงลาย (*Aedes* spp.) เป็นพาหะ หรือโรคที่ทำให้เกิดความผิดปกติทางร่างกายอย่างโรคเท้าช้าง (elephantiasis) ที่มีแมลงพาหะเป็นยุงลาย ยุงเสือ (*Mansonia* spp.) และยุงรำคาญ (*Culex* spp.) เป็นต้น (Thongwat, 2017) จากการศึกษาในปัจจุบันพบยุงมากกว่า 3,500 ชนิด (Rattanarithikul *et al*., 2005; Thongwat, 2017) และยุงที่สามารถพบได้ในประเทศไทยก็มีมากถึงประมาณ 450 ชนิด ใน 54 สกุล (Rattanarithikul *et al.*, 2005) การแพร่กระจายของยุงในเขตพื้นที่ต่าง ๆ ส่งผลให้รูปแบบการดำรงชีวิตและการสืบพันธุ์แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เป็นส่วนหนึ่งในการกำหนดวิวัฒนาการของยุง การมีแบคทีเรียร่วมอาศัย (endosymbiont) ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการกำหนดรูปแบบวิวัฒนาการของยุงเช่นกัน (Rasgon *et al*., 2006)

ประชากรของยุงส่วนใหญ่ถูกพบว่ามีแบคทีเรียร่วมอาศัยอยู่ร่วมมากถึงประมาณ 44% (Ding *et al*., 2020) โดยส่วนมากพบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม proteobacteria เช่น *Wolbachia* แบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทต่อชีววิทยาของยุงในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ส่งผลต่อรูปแบบการสืบพันธุ์ โดยอาจเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการเข้ากันไม่ได้ของ cytoplasm ที่เรียกว่า ‘Cytoplasmic Incompatibility (CI)’ (Zabalou *et al*., 2004) ทำให้เกิด viral interference ซึ่งส่งผลให้ปริมาณของยุงที่ติดเชื้อไวรัสและกลายเป็นพาหะนำโรคลดลง (Moreira *et al*., 2009a) หรืออาจส่งผลดีต่อการปรับตัว (fitness) ของยุง เช่น ช่วยสังเคราะห์วิตามิน B ซึ่งเป็นสารอาหารที่พบได้ต่ำในแมลงที่กินเลือดเป็นอาหาร (Rio *et al*., 2016) หรือส่งผลเสียต่อสรีรวิทยาของยุง เช่น ลดความแข็งแรงของ proboscis ของยุง ทำให้ยุงไม่สามารถดูดเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Moreira *et al*., 2009b) การกระตุ้นให้เมตาบอลิซึมของยุงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อายุขัยของยุงสั้นลง ตลอดจนการรบกวนความสามารถในการเจริญพันธุ์ การเจริญของเอ็มบริโอ และอัตราการฟักของไข่ยุง (Calvitti *et al*., 2010; Suh *et al*., 2009) การศึกษาเหล่านี้ทำให้ทราบถึงการกระจายของ *Wolbachia* กลุ่มต่าง ๆ ในประชากรยุงในธรรมชาติ หากยุงมี *Wolbachia* ในสายพันธุ์ต่างกัน ก็อาจส่งผลกระทบต่อชีววิทยาของยุงได้แตกต่างกัน ถึงอย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับการแพร่กระจายของ *Wolbachia* ในประชากรยุงในธรรมชาติและการศึกษาความหลากหลายของ *Wolbachia* ในยุงที่พบในประเทศไทยยังคงมีอยู่น้อย ความเข้าใจในวิวัฒนาการของยุงที่อยู่ร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยเหล่านี้ จะเป็นอีกหนึ่งเครื่องมือที่สำคัญที่จะทำให้มนุษย์สามารถควบคุมหรือจัดการการเกิดโรคระบาดที่มาจากยุงได้

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรากฏของ *Wolbachia* ในประชากรยุงที่อาจพบได้ในบางบริเวณของพื้นที่ภาคกลางตอนล่างของประเทศไทย โดยตรวจหา *Wolbachia* ด้วยวิธี PCR ที่ใช้ DNA primers ที่จำเพาะกับ *Wolbachia* ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของ *Wolbachia* กลุ่มต่าง ๆ ในแง่ของวิวัฒนาการ ซึ่งอาจใช้ในการประเมินผลกระทบของ *Wolbachia* ต่อชีววิทยาของยุงบางชนิดได้

## การทดลอง

### วิธีการเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างยุงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นตัวอย่างยุงที่ถูกเก็บสะสมมาจากพื้นที่เกษตรกรรม บ่อน้ำขนาดเล็กในจังหวัดนครปฐม พื้นที่อำเภอบางเลน อำเภอเมืองนครปฐม และในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี ในช่วงปี 2565-2566 ตัวอ่อนยุงถูกสำรวจด้วยวิธีใช้สวิงจับปลาสุ่มตักลงไปในแหล่งน้ำขังที่มีลักษณะเหมาะสมต่อการอาศัยของลูกน้ำยุง โดยดัดแปลงจากการศึกษาจาก Brisco *et al*. (2016) ตัวเต็มวัยสำรวจด้วยกับดักแสงไฟ (UV-C light trap) ดัดแปลงจากการศึกษาของ Silva *et al*. (2019) โดยผสมน้ำยาล้างจาน :

น้ำเปล่า ในอัตราส่วน 1 : 40 ตั้งกับดักเป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง ก่อนจะนำตัวอย่างแมลงที่ได้ใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง นอกจากนี้ใช้สวิงจับแมลงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางปากสวิง 36 cm ด้ามสวิงยาว 1.5 m สุ่มโฉบตามยอดหญ้าตามพื้นที่ใกล้แหล่งน้ำ

ตัวอย่างแมลงทั้งในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย จะถูกเก็บใน 95% ethanol ทั้งหมด และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -4°C ก่อนนำมาตรวจสอบชนิดด้วยการจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาในเบื้องต้น โดยอาศัยคู่มือการจัดจำแนกของ Rattanarithikul *et al*. (2005) และ World Health Organization. Regional Office for South-East (2020) จากนั้นจะนำไปสกัด genomics DNA ทั้งนี้ชนิดของยุงจะถูกยืนยันด้วยวิธี DNA barcoding อีกครั้ง

**การสกัด genomics DNA**

สกัด DNA แยกยุงแต่ละตัว โดยใช้ยุง 10-20 ตัว ต่อชนิด (ยุงตัวเต็มวัย 10 ตัว ตัวอ่อน 10 ตัว) ขึ้นอยู่กับจำนวนของยุงที่สำรวจได้ จากนั้นจะนำยุงมาสกัด DNA ด้วยวิธี SDS-EB protocol ดัดแปลงจากการศึกษาของ Asghar *et al*. (2015) กล่าวโดยย่อคือ

ใส่ยุงที่ล้างสะอาดและทำให้แห้งแล้วลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 mL 1 ตัว/หลอด เติม 150 µL SDS-EB (1M Tris- HCl pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0, 5M NaCl, 10% SDS, double-distilled water) ลงไปในหลอด ให้ท่วมตัวอย่างยุง บดยุงให้ละเอียดด้วย micro-pestle ก่อนจะ vortex สารเข้าด้วยกัน นำไปบ่ม 35°C นาน 10 นาที จากนั้นจึงเติม isoamyl alcohol : chloroform (1 : 24) ปริมาตร 250 µL ลงไปในหลอด นำไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ 14000 rpm นาน 5 นาที เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนดังกล่าว จะเห็นสารละลายแยกชั้นออกจากกันอย่างชัดเจน ให้ถ่ายสารละลายส่วนใสปริมาตร 100 µL ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL หลอดใหม่ พร้อมกับเติม 200 µL isopropanol แล้วพลิกหลอดไปมาให้เข้ากันอย่างเบามือ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000 rpm นาน 4 นาที ในขั้นตอนนี้จะเริ่มสังเกตเห็นตะกอนที่บริเวณก้นหลอด ให้เทสารละลายเหนือตะกอนทิ้ง ก่อนจะเติม 70% ethanol ปริมาตร 150 µL นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14000 rpm 4 นาที เทสารละลายเหนือตะกอนทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการเปิดฝาตั้งทิ้งไว้ (air dry) จากนั้นละลายตะกอน genomics DNA ด้วย molecular water ปริมาตร 50 µL เก็บตัวอย่าง DNA ที่สกัดได้ไว้ที่ -20°C จนกว่าจะถึงการศึกษาต่อไป

**การตรวจหา *Wolbachia* ด้วยวิธี PCR**

ตัวอย่าง DNA ของยุงแต่ละตัวจะถูกนำมาตรวจเช็คคุณภาพ DNA ด้วยการทำ PCR ของยีนตำแหน่ง *COI* ของยุง เพื่อให้มั่นใจว่า DNA ที่สกัดมีคุณภาพที่ดีเพียงพอสำหรับการตรวจหา endosymbiont (ตัวอย่าง PCR product ของยีน *COI* จะถูกส่งไปทำ DNA sequencing เพื่อนำมายืนยันชนิดของยุงด้วยวิธี DNA barcoding) จากนั้นจะสำรวจ *Wolbachia* โดยใช้ primers ที่เพิ่มจำนวนยีนในตำแหน่ง *16S rRNA* โดยมีลำดับเบสของ primers และ PCR conditions ดังแสดงใน Table 1 ซึ่ง primers W-Spec F/R นี้ได้เคยถูกใช้สำหรับการตรวจหา *Wolbachia* ในยุงมาแล้วจากการศึกษาก่อนหน้า (Gomes *et al*., 2017; Sawasdichai *et al*., 2019) ตัวอย่าง DNA ที่ถูกใช้เป็น positive control คือตัวอย่าง DNA ของแมลงที่เคยตรวจสอบว่ามี *Wolbachia* และผ่านการทำ PCR มาแล้ว ส่วน negative control ใช้ molecular-graded $H_2O$ ที่ไม่มี DNA ปนเปื้อน หลังจากนั้นตรวจสอบผลของ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose

**Table 1** List of PCR primers in this study. All the primers were used under the same PCR conditions, adapted from Thongprem *et al*. (2020). Initial denaturation step at 95°C for 5 min, 35 cycles of these following steps; denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 52°C 30 s and extension at 72°C 50 s, finally, the final extension was run at 72°C for 7 min.

| Target gene | Primer name | Primer sequence (5'-3') | Product size (bp) | References |
|---|---|---|---|---|
| **Mosquito (Diptera: Culicidae)** | LCO_1490 | GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G | 710 | Folmer *et al*. (1994) |
| ***COI* gene** | HCO_2198 | TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA | | |
| ***Wolbachia*** | W-Spec F | CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG | 438 | Werren and |
| ***16S rRNA* gene:** | W-Spec R | AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC | | Windsor (2000) |

**การศึกษาความหลากหลายของ *Wolbachia* ด้วยวิธี Phylogenetic tree**

หลังจากตรวจสอบการติดเชื้อ *Wolbachia* ด้วยเทคนิค PCR เรียบร้อยแล้ว จะนำตัวอย่างที่ให้ผล positive กับการทดสอบไปส่งตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีการ Barcode-Tagged Sequencing (BT-SeqTM) เมื่อได้ DNA sequence ของ *Wolbachia* แล้ว จะนำมา blast กับฐานข้อมูล NCBI และดึงข้อมูลของ *Wolbachia* ในสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงมาร่วมวิเคราะห์ เมื่อได้ sequence ที่ต้องการทั้งหมดแล้วจึงทำ multiple alignment ด้วยวิธี muscle alignment (Edgar, 2004) ใน MEGA XI (Tamura *et al*., 2021) จากนั้นตรวจสอบโมเดลที่เหมาะสมและสร้าง Phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Maximum likelihood ด้วยค่า bootstrap 1,000 ครั้ง โดยใช้ IQ-tree จาก CIPRES (Minh *et al*., 2020) และตรวจสอบภาพ phylogenetic tree ด้วย FigTree version 1.4.4 ลำดับเบสบน DNA sequence ของ *Wolbachia* ที่พบในการศึกษานี้ได้ลงทะเบียนในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้หมายเลข accession number PQ470917-PQ470924

## ผลการทดลองและอภิปรายผล

จากการศึกษาตัวอย่างยุงจำนวน 144 ตัว จำแนกได้เป็น 2 วงศ์ย่อย ได้แก่ Subfamily Anophelinae และ Subfamily Culicinae ซึ่งจำแนกได้ทั้งหมด 4 สกุล 6 ชนิด โดยการสำรวจพบทั้งยุงในระยะตัวอ่อนจำนวน 98 ตัว และ ตัวเต็มวัยจำนวน 46 ตัว โดยส่วนมากยุงที่พบในระยะตัวเต็มวัยสำรวจได้จากการใช้กับดักแสงไฟ โดยในการศึกษานี้สำรวจพบตัวเต็มวัยของ *Anopheles* sp. มากที่สุดในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี และชนิดที่พบตัวอ่อนยุงมากที่สุดคือ *Udaya argyrurus* โดยพบได้ทั้งในพื้นที่อำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐม และ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี (Table 2) ยุงที่สำรวจพบส่วนใหญ่จัดเป็นยุงที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสามารถพบการแพร่กระจายพันธุ์ได้มากในเขตร้อน (Thongwat, 2017) เช่น ยุงลาย *Aedes* sp. ซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออก โรคไข้เหลือง โรคชิคุนกุนยา และโรคไข้ซิกา โรคเหล่านี้จัดเป็นโรคระบาดร้ายแรงที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส (Thongwat, 2017) ยุงรำคาญ *Culex* sp. มีรายงานเป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง ซึ่งเกิดจากการได้รับพยาธิตัวกลมฟิลาเรีย (Thongwat, 2017) ยุงก้นปล่อง *Anopheles* sp. เป็นพาหะนำโรคไข้มาลาเรีย เกิดจากการได้รับเชื้อ *Plasmodium* sp. (Thongwat, 2017) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่ายุงเหล่านี้สามารถเป็นโฮสต์ให้กับแบคทีเรียร่วมอาศัยได้อีกหลายชนิด เช่น *Spiroplasma, Rickettsia* และ *Wolbachia* เป็นต้น (Pilgrim *et al*., 2021; Shimooka *et al*., 2021; Sicard *et al*., 2019)

**Table 2** *Wolbachia* screening from PCR assays. Number of positive individuals are before the brackets. Location indicates in abbreviation letters; BL = Bang Lane, Nakhon Pathom, PT = Mueang, Nakhon Pathom, PB = Mueang Petchaburi.

| | Mosquito species | Location | Number positive (Number tested) |
|---|---|---|---|
| Subfamily Anophelinae | | | |
| 1 | *Anopheles* sp. | PB | 0 (38) |
| Subfamily Culicinae | | | |
| 2 | *Aedes* sp. | BL, PB | 0 (26) |
| 3 | *Ae. albopictus* | PT, PB | 4 (4) |
| 4 | *Culex* sp. | PT, BL | 1 (9) |
| 5 | *Cx. quinquefasciatus* | PT | 3 (13) |
| 6 | *Udaya argyrurus* | BL, PB | 0 (54) |
| | | **Total** | 8 (144) |

จากการตรวจสอบ *Wolbachia* ด้วยวิธี PCR พบยุงที่ให้ผล positive 3 ชนิด ได้แก่ *Aedes albopictus*, *Culex* sp. และ *Cx. quinquefasciatus* (Table 2) โดยยุง *Ae. albopictus* ติดเชื้อที่ความถี่สูงสุด 100% และยุงที่พบอัตราการติดเชื้อต่ำที่สุดคือ ยุง *Culex* sp. มีอัตราการติดเชื้อที่ 11.1% ดังแสดงใน Table 3 ความถี่ในการติดเชื้อเหล่านี้อาจสะท้อนถึงความแข็งแรงของการเกิด co-evolution ของยุงกับ *Wolbachia* ซึ่งความถี่ในการติดเชื้อที่น้อยอาจเป็นข้อบ่งชี้ว่า แบคทีเรียร่วมอาศัยเหล่านี้ไม่ได้ส่งผลดีต่อ fitness ของแมลงที่เป็นโฮสต์มากนัก (McCutcheon *et al*., 2019) มีโอกาสเป็นไปได้ว่า

*Wolbachia* อาจมีบทบาทเป็นปรสิตทางการสืบพันธุ์ (reproductive parasite) ของยุงได้ (Adams *et al*., 2021; Sicard *et al*., 2019) ถึงอย่างไรก็ตามความถี่ในการติดเชื้อ *Wolbchia* ของ *Ae. albopictus* ที่มีค่าสูงยังเป็นการศึกษาจากตัวอย่างยุงเพียง 4 ตัวเท่านั้น ทั้งนี้หากมีการศึกษาในประชากรยุงที่มากขึ้นหรือเก็บตัวอย่างยุงหลายกลุ่มประชากรอาจทำให้เข้าใจความถี่ในการติดเชื้อของ *Wolbachia* ในยุงแต่ละชนิดได้ดียิ่งขึ้น

**Table 3** Prevalence of *Wolbachia* in positive samples from PCR assays.

| | Mosquito species | Number tested | | Number Infected | | % Infection |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Juvenile | Adults | Juvenile | Adults | |
| 1 | *Aedes albopictus* | 0 | 4 | - | 4 | 100% |
| 2 | *Culex* sp. | 0 | 9 | - | 1 | 11.1% |
| 3 | *Cx. quinquefasciatus* | 12 | 1 | 2 | 1 | 23.1% |

ความหลากหลายของ *Wolbachia* และความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการกับ *Wolbachia* สายพันธุ์อื่นที่ blast ได้จากฐานข้อมูล NCBI พบว่า *Wolbachia* จากการศึกษานี้จัดอยู่ใน Supergroup B ทั้งหมด โดย *Wolbachia* ที่พบในยุง *Ae. albopictus* จากเพชรบุรี และอำเภอเมืองนครปฐม มี haplotype แบบเดียวกัน ส่วน *Wolbachia* ที่พบในลูกน้ำยุง *Cx. quinquefasciatus* จากอำเภอบางเลนจังหวัดนครปฐมกลับพบ variation ที่มีความแตกต่างกันเล็กน้อย ถึงอย่างไรก็ตาม *Wolbachia* ที่พบทั้งในยุงสกุล *Aedes* และ *Culex* ถูกจัดเป็น sister group กันดังแสดงใน Phylogenetic tree (Figure 1)

*Wolbachia* ที่มีการตรวจพบทั้งหมดในยุงทั้ง 2 สกุล จัดอยู่ใน Supergroup B ซึ่งเป็นกลุ่มของ *Wolbachia* ที่มักมีบทบาทในแง่ของการเป็นปรสิตทางการสืบพันธุ์ของแมลงและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

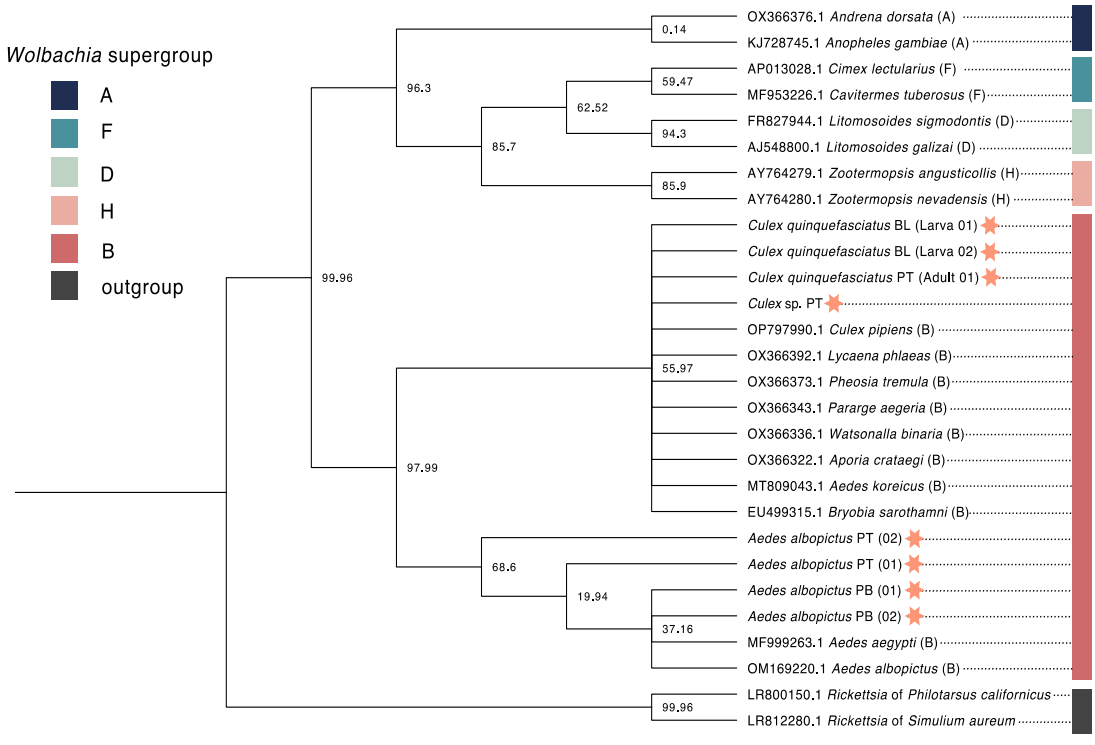


**Figure 1** Phylogenetic tree analysis of *Wolbachia* based on *16S rRNA* gene sequences from mosquitoes in this study (marked with orange stars), combining related *Wolbachia* strains as reference supergroups obtained from NCBI database. GenBank accession numbers and the host species are at the end of the branches. The topology was constructed by K2+G model in IQ-tree from CIPRES with Maximum Likelihood method. Visualisation of the phylogenetic tree was conducted in FigTree version 1.4.4. Number at the nodes represent bootstrap values from 1,000 sampling events.

ชนิดต่าง ๆ (Adams *et al*., 2021; Ant *et al*., 2020) โดย *Wolbachia* เหล่านี้ได้มีรายงานพบในแมลงหลายชนิด ทั้งแมลงในอันดับ Lepidoptera เช่น ผีเสื้อกลางคืน swallow prominent (*Pheosia tremula*) oak hook-tip (*Watsonalla binaria*) ผีเสื้อกลางวัน speckled wood (*Pararge aegeria*) ดังปรากฏใน Figure 1 นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของแมลงอันดับ Hymenoptera เช่น แตนเบียน (*Nasonia vitripennis*) และอันดับ Hemiptera เช่น แมลงหวี่ขาว whitefly (*Bemisia tabaci*) ที่รายงานพบจากการศึกษาก่อนหน้าเป็นต้น (Bordenstein & Werren, 2000; Li *et al*., 2017)

ถึงแม้การศึกษานี้จะยังไม่พบยุงชนิดใหม่ที่ติดเชื้อ *Wolbachia* แต่ผลจากการศึกษานี้ก็เป็นหลักฐานชิ้นสำคัญที่ยืนยันการแพร่กระจายของ *Wolbachia* ทั้งในประชากรยุง *Ae. albopictus* และ *Cx. quinquefasciatus* ในพื้นที่ภาคกลางตอนล่างของไทย ก่อนหน้านี้การศึกษาในประเทศมาเลเซียเคยรายงานการพบ *Wolbachia* ในยุง *Ae. albopictus* ที่อาจมีผลต่อการแพร่กระจายของไวรัสชิคุนกุนยา (Ahmad *et al*., 2017) และจากการศึกษาของ Ant *et al*. (2020) ยังพบ *Wolbachia* ใน *Cx. quinquefasciatus* ซึ่งมีผลต่อการเกิด CI ในประชากรของยุง โดยการเกิด CI นี้จะส่งผลต่อการลดจำนวนประชากรยุงอย่างมากและอาจเหนี่ยวนำให้ยุงมีโอกาสเกิดการลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นผลกระทบเชิงลบในแง่ของวิวัฒนาการ ดังนั้นการพบ *Wolbachia* ในยุง *Ae. albopictus* และ *Cx. quinquefasciatus* ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม และจังหวัดเพชรบุรีอาจแสดงถึงแนวโน้มการลดลงของประชากรยุงเหล่านี้ หากการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตมีการวางแผนเก็บตัวอย่างยุงอย่างเป็นระบบ และศึกษาการติดเชื้อ *Wolbachia* ในประชากรยุงอย่างต่อเนื่อง อาจจะช่วยให้เข้าใจการแพร่กระจายของ *Wolbachia* ที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ของยุง ซึ่งองค์ความรู้นี้จะเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมการแพร่ระบาดของยุงได้

## สรุป

การศึกษาการแพร่กระจายของ *Wolbachia* ในประชากรยุงที่สำรวจจากอำเภอเมืองจังหวัดเพชรบุรี อำเภอบางเลน และอำเภอเมืองจังหวัดนครปฐม พบยุง 144 ตัว จำแนกเป็น 4 สกุล 6 ชนิด ได้แก่ *Aedes* sp., *Ae. albopictus*, *Anopheles* sp., *Culex* sp., *Cx. quinquefasciatus* และ *Udaya argyrurus* โดยพบการติดเชื้อ *Wolbachia* ในยุง 3 ชนิด จากการตรวจหาด้วยวิธี PCR ได้แก่ *Ae. albopictus*, *Culex* sp. และ *Cx. quinquefasciatus* จากการศึกษา phylogenetic tree ของยีนตำแหน่ง *16S rRNA* ของ *Wolbachia* พบว่าทั้งหมดถูกจัดอยู่ใน supergroup B และมีความหลากหลายแตกต่างกัน จากการเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้าคาดว่า *Wolbachia* ที่พบในการศึกษานี้อาจมีบทบาทในแง่ของการเป็นปรสิตทางการสืบพันธุ์ของยุง เช่น อาจเหนี่ยวนำให้เกิดความเข้ากันไม่ได้ของไซโทพลาสซึม (cytoplasmic incom patibility) และอาจทำให้เกิดการลดลงของประชากรยุง ถึงอย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังคงเป็นหลักฐานชิ้นสำคัญที่ช่วยให้เห็นถึงการแพร่กระจายพันธุ์ของ *Wolbachia* ในยุงบางประชากรของประเทศไทย และควรให้มีการศึกษาเก็บข้อมูลอย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นองค์ความรู้ในการควบคุมการแพร่พันธุ์ของยุงได้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับอาจารย์หลังสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาเอก จากกองทุนสนับสนุนการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สัญญาทุนเลขที่ SRIF-PRG-2567-07

## จริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง

การเก็บตัวอย่างแมลงเพื่อใช้สำหรับงานวิจัยนี้ได้ผ่านการขออนุญาตการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (คกศ. มศก.) โครงการเลขที่ 14/2565 ใบอนุญาตการใช้สัตว์ฯ เลขที่ U1-09605-2564

## เอกสารอ้างอิง

Adams, K. L., Abernathy, D. G., Willett, B. C., Selland, E. K., Itoe, M. A., & Catteruccia, F. (2021). *Wolbachia cifB* induces cytoplasmic incompatibility in the malaria mosquito vector. *Nature Microbiology, 6*(12), 1575–1582. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00998-6

Ahmad, N. A., Vythilingam, I., Lim, Y. A. L., Zabari, N., & Lee, H. L. (2017). Detection of *Wolbachia* in *Aedes albopictus* and their effects on Chikungunya virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 96*(1), 148–156. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0516

Ant, T. H., Herd, C., Louis, F., Failloux, A. B., & Sinkins, S. P. (2020). *Wolbachia* transinfections in *Culex quinquefasciatus* generate cytoplasmic incompatibility. *Insect Molecular Biology, 29*(1), 1–8. https://doi.org/10.1111/imb.12604

Asghar, U., Malik, M. F., Anwar, F., Javed, A., & Raza, A. (2015). DNA extraction from insects by using different techniques: A review. *Advances in Entomology, 3*, 132–138.

Bordenstein, S. R., & Werren, J. H. (2000). Do *Wolbachia* influence fecundity in *Nasonia vitripennis*? *Heredity, 84*(1), 54–62. https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.00637.x

Brisco, K. K., Cornel, A. J., Lee, Y., Mouatcho, J., & Braack, L. (2016). Comparing efficacy of a sweep net and a dip method for collection of mosquito larvae in large bodies of water in South Africa. *F1000 Research, 5*, 713. https://doi.org/10.12688/f1000research.8351.1

Calvitti, M., Moretti, R., Lampazzi, E., Bellini, R., & Dobson, S. L. (2010). Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the *w*Pip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology, 47*(2), 179–187. https://doi.org/10.1603/me09140

Ding, H., Yeo, H., & Puniamoorthy, N. (2020). *Wolbachia* infection in wild mosquitoes (Diptera: Culicidae): Implications for transmission modes and host-endosymbiont associations in Singapore. *Parasites & Vectors, 13*(1), 612. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04466-8

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research, 32*(5), 1792–1797. https://doi.org/10.1093/nar/gkh340

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3*(5), 294–299.

Gomes, F. M., Hixson, B. L., Tyner, M. D. W., Ramirez, J. L., Canepa, G. E., Alves e Silva, T. L., Molina-Cruz, A., Keita, M., Kane, F., Traoré, B., Sogoba, N., & Barillas-Mury, C. (2017). Effect of naturally occurring *Wolbachia* in *Anopheles gambiae* s.l. mosquitoes from Mali on *Plasmodium falciparum* malaria transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 114*(47), 12566–12571. https://doi.org/10.1073/pnas.1716181114

Li, S.-J., Ahmed, M. Z., Lv, N., Shi, P.-Q., Wang, X.-M., Huang, J.-L., & Qiu, B.-L. (2017). Plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *The ISME Journal, 11*(4), 1019–1028. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.164

McCutcheon, J. P., Boyd, B. M., & Dale, C. (2019). The life of an insect endosymbiont from the cradle to the grave. *Current Biology, 29*(11), R485–R495. https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.032

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution, 37*(5), 1530–1534. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015

Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., Rocha, B. C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L. E., Johnson, K. N., Kay, B. H., McGraw, E. A., van den Hurk, A. F., Ryan, P. A., & O'Neill, S. L. (2009a). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell, 139*(7), 1268–1278. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042

Moreira, L. A., Saig, E., Turley, A. P., Ribeiro, J. M. C., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2009b). Human probing behavior of *Aedes aegypti* when infected with a life-shortening strain of *Wolbachia*. *PLOS Neglected Tropical Diseases, 3*(12), e568. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000568

Pilgrim, J., Thongprem, P., Davison, H. R., Siozios, S., Baylis, M., Zakharov, E. V., Ratnasingham, S., deWaard, J. R., Macadam, C. R., Smith, M. A., & Hurst, G. D. D. (2021). *Torix Rickettsia* are widespread in arthropods and reflect a neglected symbiosis. *GigaScience, 10*(3), giab021. https://doi.org/10.1093/gigascience/giab021

Rasgon, J. L., Cornel, A. J., & Scott, T. W. (2006). Evolutionary history of a mosquito endosymbiont

revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 273*(1594), 1603–1611. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3493

Rattanarithikul, R., Harrison, B. A., Panthusiri, P., & Coleman, R. E. (2005). Illustrated keys to the mosquitoes of Thailand I. Background; geographic distribution; lists of genera, subgenera, and species; and a key to the genera. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 36*(Suppl 1), 1–80.

Rio, R. V. M., Attardo, G. M., & Weiss, B. L. (2016). Grandeur alliances: Symbiont metabolic integration and obligate arthropod hematophagy. *Trends in Parasitology, 32*(9), 739–749. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.002

Sawasdichai, S., Chaumeau, V., Dah, T., Kulabkeeree, T., Kajeechiwa, L., Phanaphadungtham, M., Trakoolchengkaew, M., Kittiphanakun, P., Akararungrot, Y., Oo, K., Delmas, G., White, N. J., & Nosten, F. H. (2019). Detection of diverse *Wolbachia* 16S rRNA sequences at low titers from malaria vectors in Kayin state, Myanmar. *Wellcome Open Research, 4*, 11. https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15005.4

Shimooka, M., Sakurai, Y., Muramatsu, Y., & Uchida, L. (2021). Isolation and characterization of mosquito-associated *Spiroplasma cantharicola* from *Aedes japonicus* collected in Hokkaido, Japan. *Insects, 12*(12), 1056. https://doi.org/10.3390/insects12121056

Sicard, M., Bonneau, M., & Weill, M. (2019). *Wolbachia* prevalence, diversity, and ability to induce cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Current Opinion in Insect Science, 34*, 12–20. https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.02.005

Silva, F. S., Costa-Neta, B. M., de Sousa de Almeida, M., de Araújo, E. C., & Aguiar, J. V. C. (2019). Field performance of a low cost, simple-to-build, non-motorized light-emitting diode (LED) trap for capturing adult *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica, 190*, 9–12. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.10.014

Suh, E., Mercer, D. R., Fu, Y., & Dobson, S. L. (2009). Pathogenicity of life-shortening *Wolbachia* in *Aedes albopictus* after transfer from *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology, 75*(24), 7783–7788. https://doi.org/10.1128/AEM.01331-09

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution, 38*(7), 3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120

Thongprem, P., Evison, S. E. F., Hurst, G. D. D., & Otti, O. (2020). Transmission, tropism, and biological impacts of *Torix Rickettsia* in the common bed bug *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae). *Frontiers in Microbiology, 11*, 608763. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.608763

Werren, J. H., & Windsor, D. M. (2000). *Wolbachia* infection frequencies in insects: Evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 267*(1450), 1277–1285. https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1139

World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. (2020). *Pictorial identification key of important disease vectors in the WHO South-East Asia Region*. World Health Organization. https://iris.who.int/handle/10665/332202

Zabalou, S., Riegler, M., Theodorakopoulou, M., Stauffer, C., Savakis, C., & Bourtzis, K. (2004). *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101*(42), 15042–15045. https://doi.org/10.1073/pnas.0403853101